

L1 ANSWER 1 OF 2 WPINDEX COPYRIGHT 2004 THE THOMSON CORP on STN  
AN 1994-347353 [43] WPINDEX  
DNC C1994-158234

TI Antioxidant for food or pharmaceutical - made from natural prod contg.  
cyanidine-3-O-beta glucoside.

DC B02 D13 E13

PA (NIKK-N) NIKKEN FOOD KK

CYC 1

PI JP 06271850 A 19940927 (199443) \*

6

C09K015-06

<--

ADT JP 06271850 A JP 1993-87896 19930323

PRAI JP 1993-87896 19930323

IC ICM C09K015-06

ICS A23L003-3436; C09K015-34

ICA C07H017-065

/ BINARY DATA / NAKANO9trn001.TIF

AB JP 06271850 A UPAB: 19941216

The antioxidant is made from natural product which contains  
cyanidin-3-O- (beta) -glucoside of formula (1) as effective ingredient.

It is prepared by crushing vegetable which contains  
cyanidin-3-O- (beta-glucoside, degreasing and filtering it and performing  
vacuum condensation of extract obtained by adding solvent to residue of  
filtration.

The raw material vegetable is pref. black rice (Indian rice), red  
rice (Japonica rice), black soybean or blueberry.

ADVANTAGE - The antioxidant prevents oxidn. of foods and oxidative  
stress in living body.

Dwg.0/0

FS CPI

FA AB; GI; DCN

MC CPI: D03-H01P; D03-H02; D03-L; E07-A02H

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-271850

(43)公開日 平成6年(1994)9月27日

(51)IntCl<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 9 K 15/06

A 2 3 L 3/3436

C 0 9 K 15/34

// C 0 7 H 17/065

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平5-87896

(22)出願日 平成5年(1993)3月23日

(71)出願人 591137031

日研フード株式会社

静岡県袋井市春岡723-1

(72)発明者 大澤 俊彦

愛知県春日井市押沢台7-9-8

(72)発明者 越智 宏倫

静岡県袋井市春岡693-20

(74)代理人 弁理士 鈴木 正次

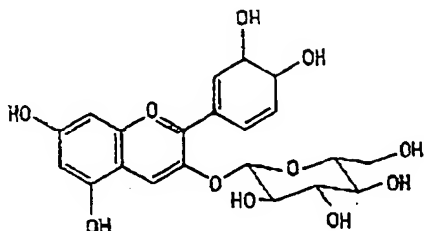
(54)【発明の名称】 天然物を原料とした抗酸化剤およびその製造方法

(57)【要約】

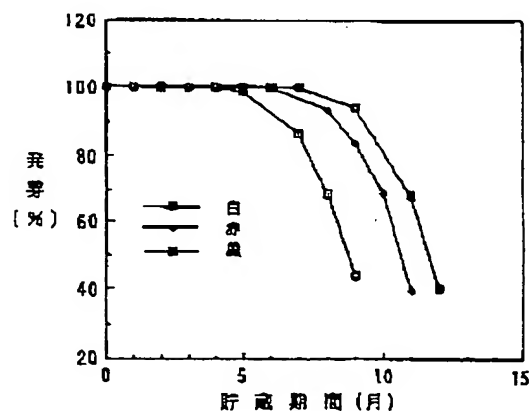
【目的】 本発明は、食品の酸化防止と生体内での酸化的ストレスを制御することなどを目的としたものである。

【構成】 次の

【化1】



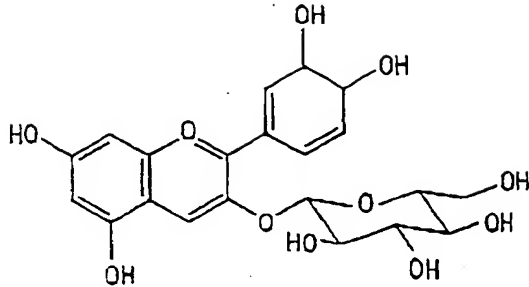
で示すシアニジン-3-O-(β)-グルコシドを有効成分とする天然物を原料とした抗酸化剤。シアニジン-3-O-(β)-グルコシド含有の植物を粉碎し、脱脂した後、濾過して、その残渣に溶媒を加えて得た抽出物を減圧濃縮することを特徴とした天然物を原料とした抗酸化剤の製造方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の

【化1】



で示すシアニジン-3-O-(β)-グルコシドを有効成分とする天然物を原料とした抗酸化剤。

【請求項2】 シアニジン-3-O-(β)-グルコシド含有の植物を粉砕し、脱脂した後、濾過して、その残渣に溶媒を加えて得た抽出物を減圧濃縮することを特徴とした天然物を原料とした抗酸化剤の製造方法。

【請求項3】 シアニジン-3-O-(β)-グルコシド含有の植物を、黒米、赤米、黒豆又はブルーベリーとすることを特徴とした請求項2記載の天然物を原料とした抗酸化剤の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、食品の酸化防止と生体内での酸化ストレスを制御することなどを目的としたシアニジン-3-O-(β)-グルコシド (Cyanidin-3-O-(β)-glucoside) を有効成分とする天然物を原料とした抗酸化剤およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来から米種子、特にインディカ米の貯蔵安定性に着目し、米糊穀に含まれるイソピテクシンというC-グルコシルフラボノイドが抗酸化的防御機構に大きな役割を果たしていることが解明されている。

【0003】一方、最近、米種子のもつ色素が種子の貯蔵・保存性に重要な役割を果たしているのではないかと推測され、色素の抗酸化性が関与していることが示唆されている。

【0004】米の中には赤色色素を有する赤米又は黒米があり、ジャポニカタイプの赤米の色素は、タンニン系色素であり、インディカタイプの赤米はアントシアニン系色素であることが報告されている。しかし、米種子の色素と抗酸化性の関連性に着目した研究例は少なく、このものの詳細な抗酸化性を中心とする生理的役割や化学的構造は明らかになっていない。

【0005】

【発明により解決すべき課題】本発明者らは、黒米や赤米等の有色米を対象に抗酸化性の研究を進め、この有効成分の単離・同定を行い、その生理的意義について抗酸

化性を中心に検討を加え、応用・開発への基礎を確立することを課題とした。

【0006】この課題のために予備的に、本発明者らは米種子を長期間室温で保存した後の発芽率を検討したところ、黒米で最も高く、次いで赤米、白米の順で、保存性と色素との間に高い相関性が示唆された(図1)。又、各種子のアルコール抽出物について抗酸化性の比較を行った。その結果、糊穀、穀粒のいずれの抽出物も黒米に最も強い抗酸化性が見出だされ、黒米中の抗酸化性色素成分の単離・同定を行い、本発明を完成させるに至った。

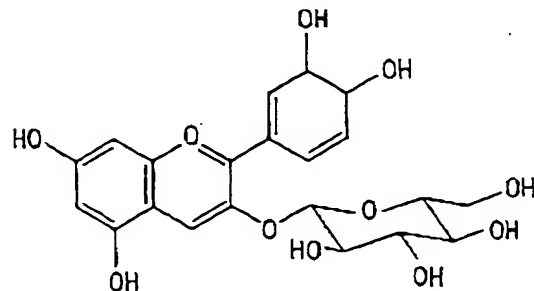
【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記目的を達成するため、まず、穀粒中の色素成分に着目して、単離、精製を行い、IR、UV、NMR、FAB-MSなどの機器分析の検討を行い、最も抗酸化性の強い主要色素の同定と安定性、特にpHによる影響や品種間での色素の種類と含量の比較と保存性や機能性との関連性についての検討を行った。

【0008】黒米をヘキサンで脱脂し、0.5%TFA-95%EtOHで抽出後、アンバーライトXAD-7を用いたカラムクロマトフィーHPLCで測定した。リテンションタイム(Retention time)とODSカラムにより分取、最大ピークのところを構造解析を行ったところ、純度検定、UV-VIS、FAB-MS、FT-IR、NMR、メタノリシス(Methanolysis)による構成糖の分析により、黒米の色素部分の主要成分(約48%)の物質構造は、次の構造式のシアニジン-3-O-(β)-グルコシド

【0009】

【化2】



と決定した。

【0010】また、この黒米の色素成分中に既に知られているイソピテクシン(Isovitexin)が含まれているかどうかHPLC分析で確認したところ含まれておらず、従来から抗酸化性のあるイソピテクシンとは異なる物質であることを確認した。次に、この黒米の抗酸化性の強さについて検討を行った。まず、インディカタイプの色素成分であるアントシアニンA・Bをチオシアネート法(thiocyanate method)で抗酸化性を分析したところ、区Aでは70%抑制、区

Bでは20%を抑制することがわかった。前記実験では、 $\alpha$ -トコフェロール (tocopherol) 96%、BHA 90%抑制であった。 $\alpha$ -toc>BHA>区A>区Bの強さの順位であった。さらにチオシアネート法によるヒドロペルオキシド量を測定すると $\alpha$ -toc>BHA>区A>区Bの抗酸化性の強さの順位であった。

【0011】尚、品種間によるチオシアネート法によるヒドロペルオキシド量の測定による抗酸化性の強さは、 $\alpha$ -toc=BHA>黒米(野生種)>黒米(インディカ)>赤米(ジャポニカ)>赤米(インディカ)となり、黒米の方が抗酸化性が強いことが確認された。

【0012】以上の結果から、黒米(インディカ)の中の主要色素は、シアニジン-3-O-( $\beta$ )-グルコシドと同定され、抗酸化性を主に有している物質であることが判明した。この物質は、従来から知られる米粉澱のイソピテキシンとは異なる新規物質である。酸性条件下でも強く、安定した抗酸化性を有することが特徴として考えられる。

【0013】本発明は、黒米(インディカ)から、抗酸化成分シアニジン-3-O-( $\beta$ )-グルコシドを単離・精製して、新規物質を得たのであるが、黒米(インディカ)に限定されることなく、当然のこと乍ら前記成分を含有する植物全般(例えば黒豆、ブルーベリー)から得ることができる。

【0014】以下、この発明を実施例により詳細に説明する。

【0015】

【実施例1】20gずつ4種の米種子を脱殻し、ブレンダーで粉碎したものを体積の60mlのn-ヘキサンによって脱脂し、吸引濾過した。その残渣を500mlの0.5%トリフルオロ酢酸(TFA)-95%エタノール溶液によって抽出、濾過したものを減圧濃縮して得たものを粗抽出物とした。

【0016】得られた色素の粗抽出物の収率は、インディカタイプの黒米が最も高かった。また、UV測定により黒米は280nmと460nmに、赤米は280nmと460nmにそれぞれ極大吸収をもつことがわかった。逆相HPLC分析では、黒米に特徴的なピークが確認された。

【0017】得られた色素の粗抽出物の抗酸化性の試験は、リノール酸の自動酸化の系で行い、チオシアネート法とTBA法によって評価した。その際、スタンダードの天然抗酸化剤として広く食品に含まれている $\alpha$ -トコフェロール、合成抗酸化剤であるt-ブチル-ヒドロキシアニソール(BHA)を比較として用いた。前記チオシアネート法は、不飽和脂肪酸の過酸化によって、生成したヒドロペルオキシドが二価鉄を三価鉄に酸化し、この三価鉄がチオシアネ酸アンモニウム( $\text{NH}_4\text{SCN}$ )と反応して赤色のロダン鉄 $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ を生成し、このロダン鉄の500nmの吸収を測定することによ

り過酸化物の量を求めるものである。チオシアネート法により脂質過酸化の初期段階を検討することができる。この方法としては、試験管に反応液を0.2mlとり、これに75%エタノール9.4ml、30%チオシアネ酸アンモニウム水溶液0.2mlを加え、0.02M塩化第一鉄-3.5%塩酸水溶液0.2mlを加えてよく攪拌し、3分後に比色計により500nmの吸光度を測定した(図2)。

【0018】TBA法は、脂質の過酸化により生成したヒドロペルオキシドの代表的な二次分解物であるマロンジアルデヒド(MDA)及びその類似物質がチオバルビツール酸(TBA)と反応して、縮合物を生成し、この縮合物の532nmの吸収を測定することによって、脂質の過酸化の後期段階を検討することができるものである。

【0019】前記具体的方法としては、キャップ付きスクリー管に反応液1.0mlを取り、これにブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)10 $\mu$ l、20%トリクロロ酢酸(TCA)0.5ml、0.67%チオバルビツール酸水溶液1.0mlを加えてよく攪拌した後、沸騰水浴中で10分間加熱し、水冷し、3,500rpmで15分間遠心分離を行い、比色計により上澄みの532nmの吸光度を測定した(図3)。

【0020】以上の結果から、どの米種子の粗抽出物にも脂質過酸化に対して抑制効果があることがわかった。その中でも黒米に比較的強い抗酸化性がみられたこと、また、粗抽出物の収率が高く、HPLCによる分離がよいこと、さらに、種子の発芽率が最も高いことから、黒米にこの着目し、色素の単離・同定を試みた。

【0021】

【実施例2】脱殻した黒米種子175gをブレンダーで粉碎した後、500mlのn-ヘキサンで脱脂し、吸引濾過した。その残渣を2.5lの0.5%TFA-95%エタノールによって抽出し、濾過したものを減圧濃縮して粗抽出物を得た。

【0022】色素粗抽出物の収量は、8.77gであった。この粗抽出物から得られた5つのフラクションのうち、UV測定と逆相HPLC分析により0.1%TFA-70%メタノール画分に最も多く色素が含まれていることがわかった。画分から3つの色素が単離され、溶出時間の早いものからピグメント(Pigment)A、B、Cと名付けた。収量はそれぞれ2.6mg、50.3mg、9.0mgであった。これら3つの色素の抗酸化性の試験を行った結果、ピグメントBに最も強い活性がみられたことから、ピグメントBについて機器分析による構造解析を行った。

【0023】まず質量分析により分子量を測定したところ、分子量449[M<sup>+</sup>]のピークが確認された。

【0024】化学構造を明確にするため、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMRのほかDBPT、HSQC、HMB

C、DQP-COSYを測定した。なお、試料は10% TFAを含む重水素置換されたメタノールに溶解した。基準物質としては、トリメチルシラン(TMS)を用いた。この結果と他の機器分析の結果をふまえて、ピグメントBはシアニジンをアグリコンとするモノグルコシドであると判断された。

【0025】また、TMS化した水層をガスクロマトグラフィーによって分析した結果、溶出時間は10分付近に糖由来のピークが確認された。標品との比較からこのピークはメチルグルコシドのものであると特定された。よって、構成糖はグルコースであることがわかった。また<sup>1</sup>H-NMRによってアノマー位のプロトンの結合定数( $J_{HH}$ )が7.6Hzであったことから、このグルコースは、β位で結合していることがわかった。

【0026】前記における機器分析の結果に数多くの文献による検討を加えて、ピグメントBの化学構造はシアニジン-3-O-(β)-グルコシドであると判明した。

【0027】また、その収量が最も高く抗酸化性も強いことから、黒米の保存性においてこの色素が中心的な役割を果たしているのではないかと推測された。

【0028】明らかにになったPigment Bの構造は、抗酸化性の発見において重要視されているo-ディヒドロキシ(o-Dihydroxy)タイプのフェノール性水酸基をもっている。

【0029】

【実施例3】黒米色素の抗酸化性について、リノール酸の自動酸化による抗酸化試験を行った。反応液の組成及び方法は実施例1と同様にした。ここでは試料溶液の濃度を1.0mMとして用いた。評価法は今までに述べたチオシアネート法、TBA法とウレア(Urea)法を使用した。また、比較として、α-トコフェロール、BHAの他、実施例2で構造が明らかにになったピグメントBのアグリコンであるシアニジンを用いて、水溶性の差による抗酸化の違いについても検討した。

【0030】また、ラット肝ミクロソームを用いた抗酸化試験についても行った。これは、ブイ、イー、ケガン(V. E. Kegan)らの方法を引用したものであり、ラット肝ミクロソームに含まれる酸素がNADPHを電子供与体として鉄を還元し、生じた三価鉄により活性酸素が生成して脂質の過酸化を引き起こすというものである。ラット肝ミクロソームの調整は、ラットから抽出された肝臓に10倍容の0.3Mマンニトール-0.01Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)を加え、ホモジネートした後、4℃、800gで10分間遠心分離する。得られた上澄液をさらに4℃、8,000gで20分間遠心分離し、その上澄液をさらに4℃、105,000gで1時間遠心分離して得られた沈殿物をミクロソームとした。あらかじめ調整したミクロソームを0.1Mリン酸緩衝液( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH

7.4)によって任意に希釈した懸濁液から0.5mlをキャップ付スクリー管に入れ、そこに1.0mMのNADPH、0.5mMエタノール溶液とした試料を0.01ml加えたものを反応液とした。この反応液を37℃の湯浴中で30分間インキュベートした後、直ちに氷冷し、ウレア法によって評価した。

【0031】脂質過酸化測定法として最も一般的に用いられているTBA法は、MDAに必ずしも特異的ではない。そこで、MDAを特異的に検出する方法として大塚らによって開発されたのが、このウレア法である。

【0032】前記ウレア法は過酸化脂質の二次的な分解によって生成したMDAが、酸性条件下ウレアと反応して2-ヒドロキシピリミジンを与える。これを逆相HPLCによって定量する。この方法によるとMDAの生成を直接的に検出することができる。方法としては、反応液1.0mlに対して2%BHTを10μl、1.2Nの塩素0.1ml、0.12Mのウレア0.1mlを加え、よく攪拌し、100℃で1時間加熱した。その後氷冷し、C<sub>18</sub>カートリッジ処理したものを逆相HPLCによって分析した。

【0033】まず、チオシアネート法により経時的に脂質過酸化度を測定した結果を図6に示した。この結果、ピグメントBとそのアグリコンは常に高い抗酸化性を示していた。次に、3通りの評価法による結果を図5、6、7に示した。ロダン鉄法が61時間後、TBA法とウレア法が192時間後のものである。どの結果からもピグメントBには強い抗酸化性が確認された。

【0034】ラットのミクロソーム抗酸化試験でも、ピグメントB及びサイアニディンは強い抗酸化性を示した(図8)。

【0035】

【発明の作用、効果】4種類の有色米から得られた色素粗抽出物は、どれもリノール酸を基質とした自動酸化の系において強い抑制効果を示したが、その中でもインディカタイプの黒米中に、強い抗酸化性を持つ色素が単離された。

【0036】機器分析によってその化学構造を検討したところ、シアニジン-3-O-(β)-グルコシドと特定された。この物質は、構造的にはフラボノイド骨格及びo-ディヒドロキシタイプのフェノール性水酸基をもっている。フラボノイド類縁体には、既にいくつもの抗酸化活性を示すものが明らかにされているほか、o-ディヒドロキシ構造はその金属に対するキレート効果によって脂質の過酸化に抑制的に働くものと認められた。

【0037】また、いくつかのモデル系を用いてその抗酸化性について検討を行ったところ、食品モデル系のみならず生体モデル系においても強い抗酸化性効果がみられた。

【図面の簡単な説明】

【図1】各種米種子の保存期間(室温37℃)と発芽率

低下との相関性グラフ。

【図2】リノール酸系における米種子粗抽出物の抗酸化活性を示すグラフ（チオシアネート法）。

【図3】リノール酸系における米種子粗抽出物の抗酸化活性を示すグラフ（TBA法）。

【図4】リノール酸系における米種子色素の抗酸化活性を示すグラフ（チオシアネート法）。

【図5】リノール酸系における米種子色素の抗酸化活性

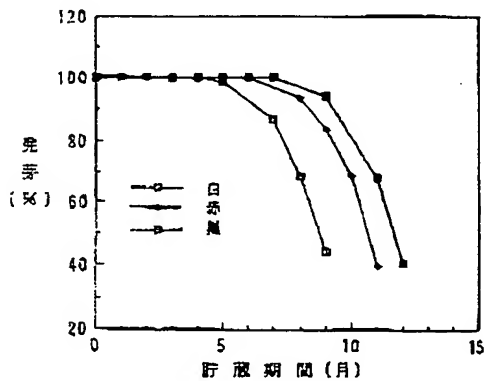
を示すグラフ（チオシアネート法）。

【図6】リノール酸系における米種子色素の抗酸化活性を示すグラフ（TBA法）。

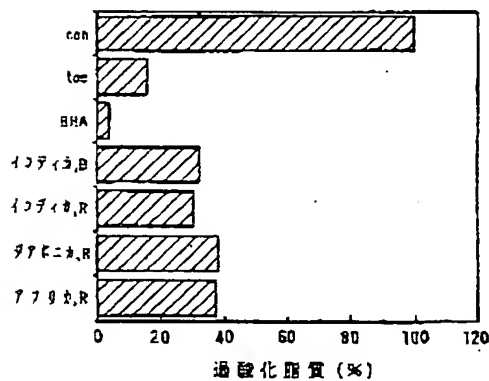
【図7】リノール酸系における米種子色素の抗酸化活性を示すグラフ（ウレア法によるMDA量定量）。

【図8】ラット肝ミクロソーム系における米種子色素の抗酸化活性を示すグラフ（ウレア法によるMDA量定量）。

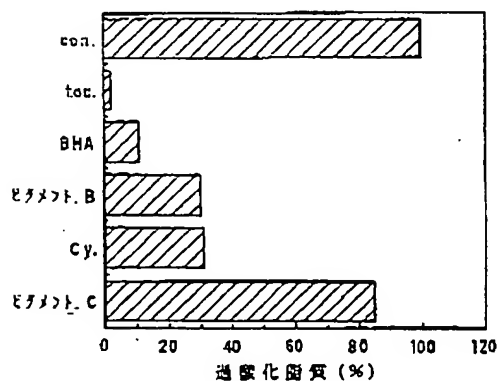
【図1】



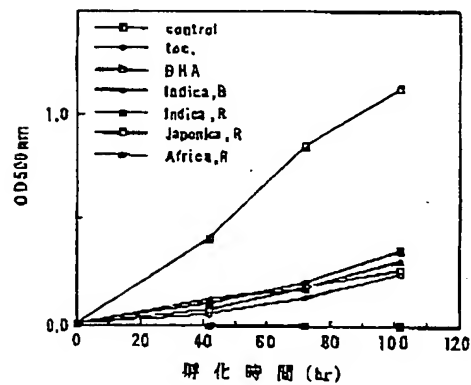
【図3】



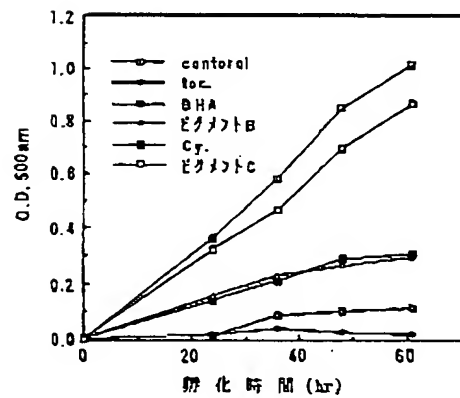
【図5】



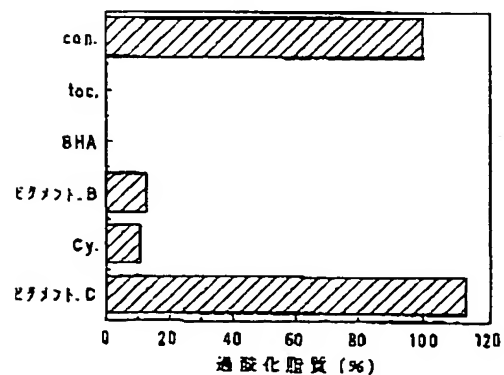
【図2】



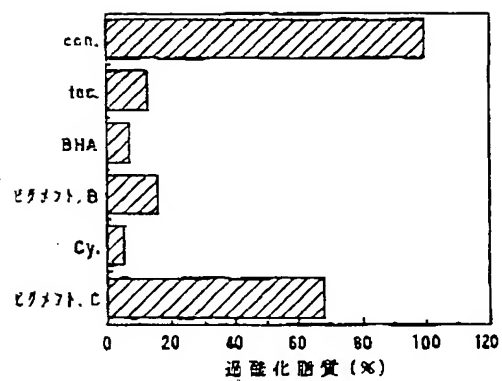
【図4】



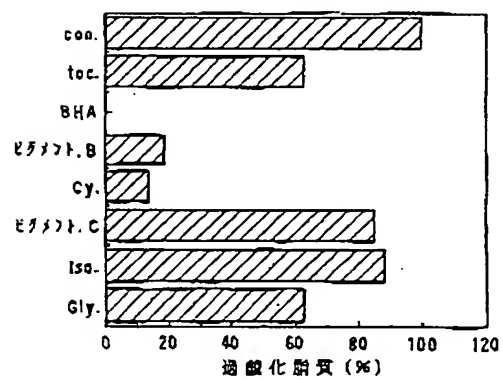
【図6】



【図7】



【図8】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**